

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12Q 1/60, 1/44, 1/26	A1	(11) 国際公開番号 WO00/17388  (43) 国際公開日 2000年3月30日 (30.03.00)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04128</p> <p>(22) 国際出願日 1999年7月30日 (30.07.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/264367 1998年9月18日 (18.09.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和メデックス株式会社 (KYOWA MEDEX CO., LTD.) [JP/JP] 〒104-0042 東京都中央区入船二丁目1番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 杉内博幸 (SUGIUCHI, Hiroyuki) [JP/JP] 〒862-8938 熊本県熊本市長嶺東二丁目39-13 Kumamoto, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 岩橋和幸 (IWAHASHI, Kazuyuki) 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和醸酵工業株式会社 知的財産部 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, UA, US, VN, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 不利にならない開示又は発明の新規性の喪失の例外に関する陳述。</p>
<p>(54) Title: METHODS FOR FRACTIONAL QUANTIFICATION OF CHOLESTEROL IN LIPOPROTEINS AND QUANTIFICATION REAGENTS</p> <p>(54) 発明の名称 リポ蛋白中のコレステロールの分別定量方法および定量用試薬</p> <p>(57) Abstract A method for fractional quantification of cholesterol in low density lipoproteins; a quantification reagent to be used therein; a method for continuous fractional quantification of cholesterol in high density lipoproteins and cholesterol in low density lipoproteins; a reagent kit to be used therein; a method for continuous fractional quantification of cholesterol in high density lipoproteins and total cholesterol; and a quantification reagent kit to be used therein.</p>		

(57)要約

本発明により、低密度リポ蛋白中のコレステロールの定量方法およびそれに用いる定量試薬が提供される。また本発明により、高密度リポ蛋白中のコレステロールおよび低密度リポ蛋白中のコレステロールの連続分別定量方法およびそれに用いる試薬キット並びに高密度リポ蛋白中のコレステロールおよび総コレステロールの連続分別定量方法およびそれに用いる定量試薬キットが提供される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LJ	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明 細 書

### リポ蛋白中のコレステロールの分別定量方法および定量用試薬

#### 技術分野

本発明は、臨床診断の分野において重要な低密度リポ蛋白（以下、LDLという）中のコレステロール（以下、LDLコレステロールという）の定量方法およびそれに用いる定量試薬に関する。また本発明は、臨床診断の分野において重要な、高密度リポ蛋白（以下、HDLという）中のコレステロール（以下、HDLコレステロールという）およびLDLコレステロールの連続分別定量方法およびそれに用いる試薬キットに関する。また、本発明は、臨床診断の分野において重要な、HDLコレステロールおよび総コレステロール〔HDL、LDL、超低密度リポ蛋白（以下、VLDLという）およびカイロミクロン（以下、CMという）中の全コレステロールをいう〕の連続分別定量方法およびそれに用いる定量試薬キットに関する。

#### 背景技術

HDLは動脈壁のコレステロールを除去し肝臓へ運ぶ働きがあるため、通称善玉と呼ばれており、またLDLは動脈壁などの末梢組織にコレステロールを運搬する働きがあるため通称悪玉と呼ばれている。臨床検査分野においてHDLコレステロール濃度、LDLコレステロール濃度および総コレステロール濃度は、動脈硬化症等の脂質に関する疾病の総合判断の指標として利用されている。

これらコレステロール濃度は、それぞれのコレステロールに特異性がある専用の試薬で個別に定量されており、自動分析機も別々に定量するように設定されているが、それぞれのコレステロールに対する特異性のさらなる向上が望まれている。また、同一検出系においてHDLコレステロール、LDLコレステロール、総コレステロール等を連続して分別定量する簡便で自動分析可能な方法は知られていない。

発明の開示

本発明の目的はLDLコレステロールの定量方法およびそれに用いる定量試薬を提供することにある。

また本発明の目的は、同一検体のHDLコレステロールおよびLDLコレステロールの連続分別定量方法およびそれに用いる定量試薬キットを提供することである。また、本発明の目的は、同一検体のHDLコレステロールおよび総コレステロールの連続分別定量方法およびそれに用いる定量試薬キットを提供することである。

本発明は、以下の(1)から(27)に関する。

- (1) a) 生体試料、  
b) コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼ（以下、CH酵素類という）および  
c) LDLコレステロールのみにb)記載のCH酵素類を作用させる試薬の存在下、コレステロールの反応を行い、生成する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりLDLコレステロール濃度を定量することを特徴とする、生体試料中のLDLコレステロールの定量方法。
- (2) LDLコレステロールのみにCH酵素類を作用させる試薬が、少なくともポリオキシエチレン誘導体とポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン共重合体とを含有する試薬である(1)記載の定量方法。
- (3) ポリオキシエチレン誘導体が、ポリオキシエチレンアルキルエーテルまたはポリオキシエチレンアルキルアリアルエーテルである(2)記載の定量方法。
- (4) ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン共重合体が一般式(I)  

$$\text{HO}-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a-(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_c-\text{H} \quad (\text{I})$$
[式中、a、bおよびcは同一または異なって1～200の整数を表す。]  
で表される界面活性剤である(2)または(3)記載の定量方法。

(5) a) 生体試料、  
b) CH酵素類および  
c) HDLコレステロールにのみb)記載のCH酵素類を作用させる試薬の存在下、第1のコレステロールの反応を行い、生成する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりHDLコレステロール濃度を定量し、次いで、

d) LDLコレステロールのみにb)記載のCH酵素類を作用させる試薬を添加して、第2のコレステロールの反応を行い、生成する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりLDLコレステロール濃度を定量することを特徴とする、生体試料中のHDLコレステロールおよびLDLコレステロールの分別定量方法。

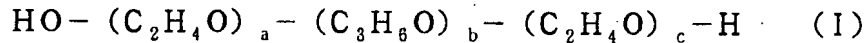
(6) a) 生体試料、  
b) CH酵素類および  
c) HDLコレステロールのみにb)記載のCH酵素類を作用させる試薬の存在下、第1のコレステロールの反応を行い、生成する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりHDLコレステロール濃度を定量し、次いで、

d) CH酵素類および  
e) LDLコレステロールのみにd)記載のCH酵素類を作用させる試薬を添加して、第2のコレステロールの反応を行い、生成する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりLDLコレステロール濃度を定量することを特徴とする、生体試料中のHDLコレステロールおよびLDLコレステロールの分別定量方法。

(7) LDLコレステロールのみにCH酵素類を作用させる試薬が、少なくともポリオキシエチレン誘導体とポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体とを含有する試薬である(5)または(6)記載の定量方法。

(8) ポリオキシエチレン誘導体が、ポリオキシエチレンアルキルエーテルまたはポリオキシエチレンアルキルアリールエーテルである(7)記載の定量方法

(9) ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体が一般式 (I)



[式中、a、bおよびcは同一または異なって1～200の整数を表す。]

で表される界面活性剤である(7)または(8)記載の定量方法。

(10) a) 生体試料、

b) CH酵素類および

c) HDLコレステロールのみにb)記載のCH酵素類を作用させる試薬の存在下、第1のコレステロールの反応を行い、生成する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりHDLコレステロール濃度を定量し、次いで、

d) 全てのリポ蛋白中のコレステロールにb)記載のCH酵素類を作用させる試薬を添加して、第2のコレステロールの反応を行い、生成する過酸化水素または還元型補酵素を測定することにより総コレステロールを定量することを特徴とする、生体試料中のHDLコレステロールおよび総コレステロールの分別定量方法。

(11) a) 生体試料、

b) CH酵素類および

c) HDLコレステロールのみにb)記載のCH酵素類を作用させる試薬の存在下、第1のコレステロールの反応を行い、生成する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりHDLコレステロール濃度を定量し、次いで、

d) CH酵素類および

e) 全てのリポ蛋白中のコレステロールにd)記載のCH酵素類を作用させる試薬を添加して、第2のコレステロールの反応を行い、発生する過酸化水素または還元型補酵素を測定することにより総コレステロールを定量することを特徴とする、生体試料中のHDLコレステロールおよび総コレステロールの分別定量方法。

(12) HDL中のコレステロールのみにCH酵素類を作用させる試薬が、HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬である(5)～(11)のいずれかに記載の定量方法。

(13) HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬がさらに凝集したリポ蛋白を溶解しない非イオン性界面活性剤を含有する(12)記載の定量方法。

(14) HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬が、ヘパリンまたはその塩、リンタングステン酸またはその塩、デキストラン硫酸またはその塩、ポリエチレングリコール、硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、硫酸化オリゴ糖またはその塩、もしくはこれらの混合物、および2価の金属塩からなる試薬である(12)または(13)記載の定量方法。

(15) 第1のコレステロールの反応に使用するCH酵素類が化学修飾された酵素であり、第2のコレステロールの反応に使用するCH酵素類が化学修飾されていない酵素である(6)または(11)記載の定量方法。

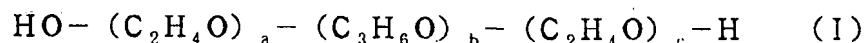
(16) 全てのリポ蛋白中のコレステロールにCH酵素類を作用させる試薬が、リポ蛋白を溶解する界面活性剤を含む試薬である(10)～(15)のいずれかに記載の定量方法。

(17) CH酵素類およびLDLコレステロールのみにCH酵素類を作用させる試薬からなるLDLコレステロール定量用試薬。

(18) LDLコレステロールのみにCH酵素類を作用させる試薬が、少なくともポリオキシエチレン誘導体とポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体とを含有する試薬である(17)記載のLDLコレステロール定量用試薬。

(19) ポリオキシエチレン誘導体が、ポリオキシエチレンアルキルアールエーテルである(18)記載の定量試薬。

(20) ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体が一般式(I)



〔式中、a、bおよびcは同一または異なって1～200の整数を表す。〕

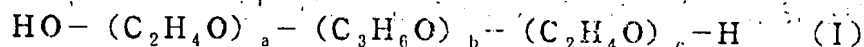
で表される界面活性剤である(18)または(19)記載のLDLコレステロール定量用試薬。

(21) 第1試薬にHDLリポ蛋白以外のリポ蛋白を凝集させる試薬およびCH酵素類を含有する試薬および第2試薬にLDLコレステロールのみにCH酵素類を作用させる試薬を含有する試薬からなる、HDLコレステロールとLDLコレステロールとを分別定量するための試薬キット。

(22) LDLコレステロールのみにCH酵素類を作用させる試薬が、ポリオキシエチレン誘導体とポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体とを含有する試薬である(21)記載の試薬キット。

(23) ポリオキシエチレン誘導体が、ポリオキシエチレンアルキルアールエーテルである(21)記載の試薬キット。

(24) ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体が一般式(I)



〔式中、a、bおよびcは同一または異なって1～200の整数を表す。〕

で表される界面活性剤である(21)または(22)記載の試薬キット。

(25) 第1試薬にHDLリポ蛋白以外のリポ蛋白を凝集させる試薬およびCH酵素類を含有する試薬および第2試薬に全リポ蛋白中のコレステロールにCH酵素類を作用させる試薬を含有する試薬からなる、HDLコレステロールと全コレステロールとを分別定量するための試薬キット。

(26) 全てのリポ蛋白中のコレステロールにCH酵素類を作用させる試薬が、リポ蛋白を溶解する界面活性剤を含む試薬である(25)記載の試薬キット。

(27) HDLリポ蛋白以外のリポ蛋白を凝集させる試薬が、ヘパリンまたはその塩、リンタングステン酸またはその塩、デキストラン硫酸またはその塩、ポリエチレングリコール、硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、硫酸化オリゴ糖またはその塩、もしくはこれらの混合物、および2価の金属塩からなる試薬で



ある(21)～(26)のいずれかに記載の試薬キット。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、上記のごとく各種リポ蛋白を含む生体試料にLDLコレステロールのみにCH酵素類を作用させる特定の試薬(以下、試薬Aという)を添加してLDLコレステロールを定量する方法およびそれに用いる試薬に関する。

また本発明は、上記のごとく各種リポ蛋白を含む生体試料にHDLコレステロールのみにCH酵素類を作用させる特定の試薬(以下、試薬Bという)を添加してHDLコレステロールを定量し、次いで試薬Aを添加してLDLコレステロールを定量する分別定量方法およびそれに用いる試薬キットに関する。

また本発明は、上記のごとく各種リポ蛋白を含む生体試料に試薬Bを添加してHDLコレステロールを定量し、次いで全てのリポ蛋白中のコレステロールにCH酵素類を作用させる試薬(以下、試薬Cという)を添加して総コレステロールを定量する分別定量方法およびそれに用いる試薬キットに関する。

本発明を適用する生体試料は、特に限定されず、具体的には血液自体または血漿、血清等血液画分を該試料として使用することができる。

本発明のコレステロールを定量するための反応は水性媒体中、特に緩衝液中で行われる。

緩衝液に使用する緩衝剤としては、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、リン酸緩衝剤、ホウ酸緩衝剤およびグッドの緩衝剤等があげられる。グッドの緩衝剤としては、N-(2-アセタミド)-2-アミノエタンスルホン酸(ACES)、N-(2-アセタミド)イミノ二酢酸(ADA)、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸(BES)、3-[N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(DIPSO)、N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸(HEPES)、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(以下、MESという)、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(以下、MOPSと

いう)、3-(N-モルホリノ)-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(MOPSO)、ピペラジン-N, N'-ビス(2-エタンスルホン酸)(以下、PIPESという)、ピペラジン-N, N'-ビス(2-ヒドロキシプロパン-3-スルホン酸)(POPSO)等があげられる。

緩衝液のpHは5~10、好ましくは6~9である。緩衝剤の使用濃度は、5~500mM、好ましくは20~200mMである。

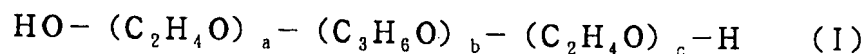
LDLコレステロールのみにCH酵素類を作用させる試薬Aは、HDL、VLDLおよびCM中のコレステロールにはそれらCH酵素類を作用させない試薬である。試薬Aは、後述のHDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬の存在下でもLDLコレステロールのみにCH酵素類を作用させることができる。

該試薬Aとしては、例えば少なくともポリオキシエチレン誘導体とポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体とを含有する試薬等があげられる。

ポリオキシエチレン誘導体としては、ポリオキシエチレンアルキルアリアルエーテルおよびポリオキシエチレンアルキルエーテル等があげられ、該アルキルとしては、炭素数8以上の、例えばオクチル、ノニル等があげられ、該アリアルとしては、フェニル等があげられる。

具体的なポリオキシエチレン誘導体としては、例えばノニオンHS-210、ノニオンHS-215、ノニオンNS-208.5、ノニオンHS-208(以上、日本油脂社製)、エマルゲンL-40、エマルゲン911、エマルゲン810(以上、花王社製)等の市販品があげられる。ポリオキシエチレン誘導体の親水性・親油性バランス(以下、HLBという)は、9~20が好ましい。

ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体としては、ポリオキシエチレンとポリオキシプロピレンのランダム共重合体でもブロック共重合体でもよく、例えば一般式(I)



[式中、a、bおよびcは同一または異なって1~200の整数を表す。]で表

される化合物があげられる。

一般式(I)で表される化合物としては、例えば、プロニックL-121、プルロニックL-122、プルロニックL-101、プルロニックP-103、プルロニックF-108等の市販品(いずれも旭電化社製)があげられる。また、一般式(I)で表される化合物中のポリプロピレングリコール基の分子量としては、2,050以上が好ましく、2,750以上がより好ましく、3,250以上が特に好ましい。ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体のHLBは、1~6が好ましい。

ポリオキシエチレン誘導体およびポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体の使用濃度は特に限定されないが、それぞれ独立に0.001~10%が好ましく、0.01~5%がより好ましく、0.05~1%が特に好ましい。

HDLコレステロールのみにCH酵素類を作用させる試薬Bとしては、HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬、およびHDL以外のリポ蛋白に対する抗体等があげられる。

HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬は、該リポ蛋白の凝集剤および/または2価の金属塩を含むものが用いられる。凝集剤としては、ヘパリンまたはその塩、リンタングステン酸またはその塩、デキストラン硫酸またはその塩、ポリエチレングリコール、硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、硫酸化オリゴ糖またはその塩、もしくはこれらの混合物などがあげられ、シクロデキストリンとしては、 $\alpha$ -シクロデキストリン、 $\beta$ -シクロデキストリン、 $\gamma$ -シクロデキストリンなどがあげられ、オリゴ糖としては、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースなどがあげられ、塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、アンモニウム塩、マグネシウム塩などがあげられる。2価の金属塩としては、マグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩、ニッケル塩などがあげられる。

凝集剤としては、0.02～10mMの分子量5,000～20,000のヘパリンまたはその塩、0.1～10mMの分子量4,000～8,000のリンタングステン酸またはその塩、0.01～5mMの分子量10,000～500,000のデキストラン硫酸またはその塩、0.1～20mMの分子量1,000～10,000のデキストラン硫酸またはその塩、0.3～100mMの分子量4,000～25,000のポリエチレングリコール(PEG)、0.1～50mMの分子量1,000～3,000の硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、0.1～50mMの分子量400～3,000の硫酸化オリゴ糖またはその塩、もしくはそれらの混合物などが用いられる。好ましくは、0.03～1mMの分子量14,000～16,000のヘパリンまたはその塩、0.1～3mMの分子量5,000～7,000のリンタングステン酸またはその塩、0.01～5mMの分子量150,000～250,000のデキストラン硫酸またはその塩、0.1～10mMの分子量1,000～5,000のデキストラン硫酸またはその塩、1.0～50mMの分子量5,000～22,000のPEG、0.1～10mMの分子量1,000～2,000の硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、0.1～10mMの分子量400～2,000の硫酸化オリゴ糖またはその塩、もしくはそれらの混合物などが用いられる。

2価の金属塩としては、0.1～50mMのマグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩、ニッケル塩、コバルト塩などがあげられ、好ましくは、0.1～50mMのマグネシウム塩が用いられる。

HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬には凝集したりリポ蛋白を溶解しない非イオン性界面活性剤を含有させるのが好ましい。

凝集したりリポ蛋白を溶解しない非イオン性界面活性剤としては、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルアールエーテル、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩等があげられる。これらのうち

、ポリオキシエチレンアルキルエーテルとしては、ポリオキシエチレンエーテル [エマルゲン 220 (花王社製) 等] が、ポリオキシエチレンアルキルアールエーテルとしては、市販品としてエマルゲン B 66 等が、ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン縮合物としては、市販品としてプルロニック F 88 (旭電化社製) 等が、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸ナトリウム [市販品としては、エマール 20C (花王社製) 等] が、アルキルベンゼンスルホン酸塩としては、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムが好ましい。

凝集したりポ蛋白を溶解しない非イオン性界面活性剤は、LDL コレステロールに CH 酵素類を作用させない限り組合わせて使用することができるが、単独で使用するのが好ましい。使用濃度は特に限定されないが、0.01~10% が好ましく、0.1~5% が特に好ましい。

HDL 以外のリポ蛋白に対する抗体としては、抗アポリポ蛋白 B 抗体、抗アポリポ蛋白 C 抗体、抗アポリポ蛋白 E 抗体、抗  $\beta$  リポ蛋白抗体等があげられ、単独もしくは組み合わせて用いられる。抗体としては、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。またこれらの抗体は、酵素的または化学的に分解、修飾されたものでもよい。

全てのリポ蛋白中のコレステロールに CH 酵素類を作用させる試薬 C としては、例えば全てのリポ蛋白を溶解する界面活性剤があげられる。

該界面活性剤としては、HDL、LDL、VLDL および CM のリポ蛋白を溶解する非イオン性界面活性剤等が用いられる。具体的には、市販品としてトリトン X-100 などのノニオン界面活性剤、エマルゲン 106、エマルゲン 108、エマルゲン 709 等のポリオキシエチレンアルキルエーテル類等があげられる。これらの界面活性剤は単独または組み合わせて使用することができる。使用濃度は特に限定されないが、0.01~10% が好ましく、0.1~5% が特に好ましい。

本発明に用いるコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼお

よびコレステロールデヒドロゲナーゼの活性を有する酵素としては、コレステロールエステルを加水分解する能力を有する微生物または動物由来のコレステロールエステラーゼやリポプロテインリパーゼ、コレステロールを酸化して過酸化水素を生成する微生物由来のコレステロールオキシダーゼ、微生物または動物由来のコレステロールデヒドロゲナーゼなどがあげられる。

これらの酵素は、基質に対する特異性に合わせて用いる。例えばHDLコレステロールの定量のときには該コレステロールに特異的な酵素を用い、LDLコレステロールの定量のときには該コレステロールに特異的な酵素を用いることが好ましい。これら酵素の特異性、安定性をさらにあげるためにポリエチレングリコールを主成分とする基、水溶性のオリゴ糖残基、スルホプロピル基などで該酵素を化学的に修飾したものも用いられる。また、遺伝子操作により得られる酵素も用いられる。

酵素を修飾するための試薬（化学修飾剤）としては、ポリエチレングリコールにアミノ基と結合可能な基を結合させた化合物、例えばポリエチレングリコールにN-ヒドロキシサクシンイミド基等のアミノ基と結合可能な基を結合させたサンブライト VFM4101 [日本油脂（株）製] 等、ポリアルキレングリコール構造および酸無水物構造を有するサンブライトAKMシリーズ、同ADMシリーズ、同ACMシリーズ [いずれも日本油脂（株）製：化学工学論文集、第20巻、第3号、459頁、1994年]、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールの共重合体にアミノ基と結合可能な基を結合させた化合物、ポリエチレングリコールモノメタクリルモノメチルエーテルと無水マレイン酸の共重合体等があげられる。また、ポリウレタンの化学修飾剤である活性化ポリウレタンP4000（ベーリンガーマンハイム社製 Enzyme modification set能書）、デキストランの化学修飾剤であるデキストランT40、活性化TCT（同）、1,3-プロパンサルトン等も使用できる。これら化学修飾剤により、酵素を、ポリエチレングリコールを主成分とする基、ポリプロピレングリコールを主成分

とする基、ポリプロピレングリコールとポリエチレングリコールの共重合体を有する基、構造に糖類を含む基、スルホプロピル基、ポリウレタン基等で修飾することができる。

酵素に上記化学修飾剤を反応させる方法は、蛋白質のハイブリット、稲田祐二著、共立出版（１９８７年）等に記載の方法が用いられる。例えばサンブライトを用いる場合は、酵素をpH 8以上のヘプス緩衝液等の緩衝液中に溶解し、0～50℃で例えば0.01～500倍モル量のサンブライトを添加し、5～60分間攪拌する。この反応液をそのままあるいは必要に応じて限外濾過膜により低分子物を除去して用いる。

本発明におけるコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼおよびコレステロールデヒドロゲナーゼの使用量は、反応液中、それぞれ0.01～200 U/mlが好ましく0.1～100 U/mlがより好ましい。

本発明では、HDLコレステロールの定量に使用するCH酵素類をLDLコレステロールまたはHDL以外のコレステロールもしくは総コレステロールの定量にそのまま使用することもできるし、LDLコレステロールまたはHDL以外のコレステロールもしくは総コレステロールの定量に際し新たに同一または基質特異性の異なるCH酵素類を添加することもできる。

HDLコレステロールの定量に使用するCH酵素類は、化学修飾したものを用い、LDLまたはHDL以外のリポ蛋白中のコレステロールもしくは総コレステロールの定量には化学修飾していないCH酵素類を用いることが好ましい。

本発明のコレステロールの反応では、反応の特異性に影響を及ぼさない範囲でCH酵素類を活性化するためによく使用される界面活性剤あるいはコール酸類も使用可能であり、また、グロブリンなどを可溶化するための種々の塩類を使用することもできる。

CH酵素類を活性化するための界面活性剤としては、例えばアニオン界面活性剤が0～1%の範囲で使用される。コール酸類としては、コール酸、デオキシコ

ール酸、タウロコール酸、ケノデオキシコール酸などが0～5%の範囲で使用される。アニオン界面活性剤としては1-ペンタスルホン酸塩、1-ヘキサスルホン酸塩、1-ヘプタスルホン酸塩、1-オクタスルホン酸塩などのアルキルスルホン酸塩があげられ0～5%の範囲で使用される。

塩類としては、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、塩化カリウム、硫酸カリウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、酢酸マグネシウム、塩化リチウム、硫酸リチウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸マグネシウム、硝酸カルシウムなどが0～100mMの範囲で使用される。

コレステロールの反応がコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼにより行われる場合は、過酸化水素が発生する。発生した過酸化水素は、例えばパーオキシダーゼの存在下、4-アミノアンチピリンとフェノール類、4-アミノアンチピリンとトリンダー試薬または高感度の色素源を用いて定量することができる。

フェノール類としては、例えばフェノール、4-クロロフェノール、m-クレゾール、3-ヒドロキシ-2, 4, 6-トリヨード安息香酸(HTIB)等があげられる。

トリンダー試薬(同仁化学研究所第19版総合カタログ、1994年)としては、N-スルホプロピルアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン(TOOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメチルアニリン(MAOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン(DAOS)、N-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン(TOPS)、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン(HDAOS)、N, N-ジメチル-m-トルイジン、N, N-ジスルホプロピル-3, 5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-m-アニジン、N-エチル-N-スルホプロピルアニリン、N-エチル-N-スル



ホプロピル-3, 5-ジメトキシアニリン、N-スルホプロピル-3, 5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-3, 5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-アニシジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル) アニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン等のアニリン類あるいはN-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン(EMSE)、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-アセチルエチレンジアミン等があげられる。

高感度の色素源としては、特公昭60-33479で示される10-(N-メチルカルバモイル)-3, 7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジン(MCDP)、特公平4-27839で示されるビス[3-ビス(4-クロロフェニル)メチル-4-ジメチルアミノフェニル]アミン(BCMA)、特開昭62-296で示される化合物等があげられる。

これら色素源の濃度としては、0.01~10mg/mlが好ましい。

コレステロールの反応が、基質として酸化型補酵素であるNAD(P)存在下に、コレステロールエステラーゼとコレステロールデヒドロゲナーゼにより行われる場合は、還元型補酵素であるNAD(P)Hが発生する。NAD(P)Hは、300~500nm、好ましくは330~400nm、特に好ましくは約340nmでの反応液の吸光度を測定することにより定量することができる。なお、NAD(P)Hの定量は、ジアホラーゼ、テトラゾリウム塩を添加してホルマザン色素の発色に導き、ホルマザン色素を比色して行うこともできる。

LDLコレステロール定量のための反応は、10~50℃、好ましくは30~40℃、通常37℃で、1~30分間、好ましくは2~10分間行う。

分別定量における、HDLコレステロール定量のための反応(以下、第1の反応という)は、10~50℃、好ましくは30~40℃、通常37℃で、1~30分間、好ましくは2~10分間行い、LDLコレステロールまたは総コレステ

ロール定量のための反応（以下、第2の反応という）は、10～50℃、好ましくは30～40℃、通常37℃で、1～30分間、好ましくは2～10分間行う。第2の反応の開始は、第1の反応で反応が実質的に終了した後でも第1の反応が進行中でも、HDLの定量が完了すればいかなる時期でもよい。第2の反応は、LDLコレステロールにCH酵素類を特異的に作用させる試薬Aまたは全てのリポ蛋白中のコレステロールにCH酵素類を作用させる試薬Cおよび必要に応じてCH酵素類を添加して開始する。第2の反応により発生する過酸化水素または還元型補酵素 [NAD(P)H] を定量する試薬は、第1の反応液に使用したものがそのまま使用できるが、必要により新たに添加してもよい。

本発明で、HDLコレステロールの反応後にLDLコレステロールの反応を行い、HDLコレステロールとLDLコレステロールを分別定量する場合においては、前述の通りLDLコレステロールの反応は、試薬Aを添加して開始されるが、第1のHDLコレステロールの反応が、前述のHDL以外の凝集したり蛋白を溶解しない非イオン性界面活性剤、すなわちポリオキシエチレン誘導体またはポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体のいずれかを添加して行われているときは、該第2のLDLコレステロールの反応は、HDLコレステロール反応に使用されている界面活性剤と合わせて試薬Aを構成するような界面活性剤を添加することにより開始することもできる。

各リポ蛋白中のコレステロール濃度は、検体試料を用いた場合の各反応前後の吸光度の差 ( $\Delta OD$ ) および各種リポ蛋白中のコレステロール濃度既知の試料を用いた場合の吸光度の差 ( $\Delta OD_{std}$ ) から下記の計算により算出される。

LDLコレステロール濃度は、 $\Delta OD \div \Delta OD_{std} \times$  (既知のLDLコレステロール濃度) から求めることができる。HDLコレステロール濃度は、例えば  $\Delta OD \div \Delta OD_{std} \times$  (既知のHDLコレステロール濃度) の計算により求めることができる。なお、分別定量において、第1の反応と第2の反応で生成する化合物が同一であり検出方法が同一の場合は、総コレステロール濃度は、第1の反

応前と第2の反応後の吸光度差を用いて $\Delta OD \div \Delta OD_{std} \times$  (既知の総コレステロール濃度) の計算により求めることができる。

本発明のLDLコレステロール定量試薬としては、CH酵素類およびポリオキシエチレン誘導体およびポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体を含有する試薬を含有する試薬があげられる。該LDL定量試薬には、必要に応じて前述の緩衝剤、HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬、コレステロール定量に用いられる界面活性剤、コール酸類、種々の塩類、パーオキシダーゼ等の酵素、4-アミノアンチピリンおよびトリンダー試薬等の色源体等、NAD(P)等の酸化型補酵素を含有することができる。

本発明のHDLコレステロールとLDLコレステロールとを分別定量するための試薬キットは、第1試薬と第2試薬のキットからなり、例えば第1試薬はHDL以外のリポ蛋白の凝集剤およびCH酵素類を含有する試薬からなり、第2試薬は、ポリオキシエチレン誘導体およびポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体を含有する試薬を含有する試薬からなる。

また、本発明のHDLコレステロールと総コレステロールとを分別定量するための試薬キットは、第1試薬と第2試薬のキットからなり、例えば第1試薬はHDL以外のリポ蛋白の凝集剤およびCH酵素類を含有する試薬からなり、第2試薬はすべてのリポ蛋白(HDL、LDL、VLDLおよびCM)を溶解する非イオン性界面活性剤を含有する試薬からなる。

本発明の試薬キットの第1試薬または第2試薬には、必要に応じて前述の緩衝剤、コレステロール定量に用いられる界面活性剤、コール酸類、種々の塩類、パーオキシダーゼ等の酵素、4-アミノアンチピリンおよびトリンダー試薬等の色源体等、NAD(P)等の酸化型補酵素を含有することができる。

第2試薬には、必要に応じて、第1試薬と同一または異なる起源のCH酵素類としてもよい。第1試薬に使用するCH酵素類は、前述の化学修飾された酵素とし、第2試薬に用いるCH酵素類は、化学修飾されていない酵素を用いるのが好

ましい。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明方法（図中、DB HDL-Cと表示）で得られるHDLコレステロール濃度と対照方法（L HDL-C方法、図中、S HDL-Cと表示）で得られるHDLコレステロール濃度の相関を示す。

図2は、本発明方法（図中、DB LDL-Cと表示）で得られるLDLコレステロール濃度と対照方法（L LDL-C方法、図中、S LDL-Cと表示）で得られるLDLコレステロール濃度の相関を示す。

図3は、本発明方法（図中、DB-TCと表示）で得られる総コレステロール濃度と対照方法（デタミナーL TC II方法、図中、L TC IIと表示）で得られる総コレステロール濃度の相関を示す。

図4は、本発明方法（図中、DB HDL-Cと表示）で得られるHDLコレステロール濃度と対照方法（L HDL-C方法、図中、S HDL-Cと表示）で得られるHDLコレステロール濃度の相関を示す。

図5は、本発明方法（図中、本法と表示）で得られるLDLコレステロール濃度と対照方法（図中、対照方法と表示）であるフリーデワルドの計算式より得られるLDLコレステロール濃度の相関を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

##### 実施例1 （HDLコレステロールとLDLコレステロールの定量）

##### 試薬1（pH=7）

MES（ナカライテスク社製）	20mM
デキストラン硫酸（東京化成社製）	0.23mg/ml
硫酸マグネシウム（関東化学社製）	1.5mg/ml
HDAOS（同仁化学社製）	0.23mg/ml
4-アミノアンチピリン（埼玉化成社製）	0.13mg/ml
ポリエチレングリコール修飾コレステロールエステラーゼ（*1）	

0.25 U/ml

ポリエチレングリコール修飾コレステロールオキシダーゼ (\*2)

1.65 U/ml

パーオキシダーゼ (東洋紡社製)

12.5 U/ml

\*1: 50 gのコレステロールエステラーゼ (天野製薬社製) を1 Lの0.1 M HEPES緩衝液 (pH 8.5) に溶解し、25℃にて、330 gのサンプルライトVFM4101を添加し2時間攪拌して調製した。

\*2: 50 gのコレステロールオキシダーゼ (協和醸酵工業社製) を1 Lの0.1 M HEPES緩衝液 (pH 8.0) に溶解し、15℃にて10 gのサンプルライトVFM4101を添加し2時間攪拌して調製した。

試薬2 (pH=7)

MES (ナカライテスク)

20 mM

コレステロールエステラーゼ (リボプロテインリパーゼ、東洋紡社製)

3 U/ml

コレステロールオキシダーゼ (協和醸酵工業社製)

2 U/ml

プルロニックL-121 (旭電化社製)

0.7%

エマルゲンL-40 (花王社製)

0.5%

塩化カルシウム (和光純薬社製)

0.1 mg/ml

検体として、健常人の血清30検体を用意し、下記の操作により検体中のHDLコレステロールとLDLコレステロールの定量を行った。試薬1、2.25 mlに検体30 µlを添加、攪拌し、直後585 nmの吸光度E1を測定した。続いて37℃で5分間反応後同じ吸収波長の吸光度E2を測定した。これにさらに試薬2、0.75 mlを添加、攪拌し、直後の585 nmの吸光度E3を測定した。続いて37℃で5分間反応後同じ吸収波長の吸光度E4を測定した。一方、コレステロール既知濃度の血清を同様な操作をして、各吸光度E1 std、E2 std、E3 stdおよびE4 stdを求めた。

HDLコレステロール濃度は上記吸光度から、 $(E2 - E1) \div (E2 \text{ std} - E1 \text{ std}) \times (\text{既知HDLコレステロール濃度})$  の式により求めた。同様にLDLコレステロール濃度も上記吸光度から、 $(E4 - E3) \div (E4 \text{ std} - E3 \text{ std}) \times (\text{既知LDLコレステロール濃度})$  の式により求めた。

また、別途各コレステロールの個別定量用市販キットであるデタミナーL HDL-C (協和メデックス社製) およびデタミナーL LDL-C (協和メデックス社製) を使用して各検体中のHDLコレステロール濃度、LDLコレステロール濃度を定量した。該市販キットで得られた定量値と本発明方法で得られた定量値の相関係数を計算したところ、HDLコレステロールでは0.997、LDLコレステロールでは0.988であった。

図1は、本発明方法 (図1中、DB HDL-Cと表示) で得られるHDLコレステロール濃度 (mg/dL) と対照方法 (L HDL-C方法、図1中、S HDL-Cと表示) で得られるHDLコレステロール濃度 (mg/dL) の相関図を示す。また図2は、本発明方法 (図2中、DB LDL-Cと表示) で得られるLDLコレステロール濃度 (mg/dL) と対照方法 (L LDL-C方法、図2中、S LDL-Cと表示) で得られるLDLコレステロール濃度 (mg/dL) の相関図を示す。

#### 実施例2 (HDLコレステロールとLDLコレステロールの定量)

##### 試薬1 (pH=7)

MES (ナカライテスク社製)	20 mM
リントングステン酸 (和光純薬社製)	7.5 mg/ml
硫酸マグネシウム (和光純薬社製)	1.5 mg/ml
TOOS (同仁化学社製)	0.5 mg/ml
エマルゲンB66 (花王社製)	10 mg/ml
4-アミノアンチピリン (埼京化成社製)	0.5 mg/ml
コレステロールエステラーゼ (LPBP、旭化成社製)	4 U/ml

コレステロールオキシダーゼ (rCO、刈エノル酵母社製)	2 U/ml
パーオキシダーゼ (東洋紡社製)	10 U/ml
試薬2 (pH=7)	
MES (ナカライテスク)	50 mM
コレステロールエステラーゼ (リポプロテインリパーゼ、東洋紡社製)	3 U/ml
コレステロールオキシダーゼ (協和醸酵工業社製)	2 U/ml
ブルロニックL-121 (旭電化社製)	0.7%
エマルゲンL-40 (花王社製)	0.5%
塩化カルシウム (和光純薬社製)	0.1 mg/ml

実施例1と同じ検体を用い、測定波長を555 nmにした他は実施例1と同様な操作を行ってHDLコレステロールとLDLコレステロールの定量を行った。市販キット (前述の、デタミナーL HDL-CおよびデタミナーL HDL-C) で得られた定量値と本発明方法で得られた定量値の相関係数を計算したところ、HDLコレステロールでは0.929、LDLコレステロールでは0.911であった。

### 実施例3 (HDLコレステロールと総コレステロールの定量)

#### 試薬1 (pH=7)

MES (ナカライテスク)	20 mM
デキストラン硫酸 (東京化成社製)	0.23 mg/ml
硫酸マグネシウム (関東化学社製)	1.5 mg/ml
HDAOS (同仁化学社製)	0.23 mg/ml
4-アミノアンチピリン (埼京化成社製)	0.13 mg/ml
ポリエチレングリコール修飾コレステロールエステラーゼ (*1)	0.25 U/ml
ポリエチレングリコール修飾コレステロールオキシダーゼ (*1)	

	1. 65 U/ml
パーオキシダーゼ	12. 5 U/ml
* 1 : 実施例 1 の * 1 と同様に調製	
* 2 : 実施例 1 の * 2 と同様に調製	
試薬 2 (pH = 6.75)	
MES (ナカライテスク)	30 mM
トリトン X-100 (シグマ社製)	1 g/L
コレステロールエステラーゼ (東洋紡社製)	2.4 U/ml
コレステロールオキシダーゼ (天野製薬社製)	6.25 U/ml

検体として、実施例 1 で用いた健常人血清 30 検体を用意し、下記の操作により検体中の HDL コレステロールと LDL コレステロールの定量を行った。

試薬 1、2.25 ml に検体 30  $\mu$ l を添加、攪拌し、直後 585 nm の吸光度 E1 を測定した。続いて 37℃ で 5 分間反応後同じ吸収波長の吸光度 E2 を測定した。これにさらに試薬 2、0.75 ml を添加、攪拌し、直後の 585 nm の吸光度 E3 を測定した。続いて 37℃ で 5 分間反応後同じ吸収波長の吸光度 E4 を測定した。一方、コレステロール既知濃度の血清を同様な操作をして、各吸光度 E1 std、E2 std、E3 std および E4 std を求めた。

HDL コレステロール濃度は上記吸光度から、 $(E2 - E1) \div (E2 \text{ std} - E1 \text{ std}) \times (\text{既知 HDL コレステロール濃度})$  の式により求めた。同様に総コレステロール濃度は上記吸光度から、 $(E4 - E1) \div (E4 \text{ std} - E1 \text{ std}) \times (\text{既知総コレステロール濃度})$  の式により求めた。

また、別途各コレステロールの個別定量用市販キットであるデタミナー L HDL-C (協和メデックス社製) およびデタミナー L TC II (協和メデックス社製) を使用して各検体中の HDL コレステロール、総コレステロール濃度を定量した。該市販キットで得られた定量値と本発明方法で得られた定量値の相関係数を計算したところ、HDL コレステロールでは 0.992、総コレステロ



ールでは0.999であった。

図3は、本法（図3中、DB-TCと表示）で得られる総コレステロール濃度（mg/dL）と対照方法（デタミナーL TC II方法、図3中、L TC IIと表示）で得られる総コレステロール濃度（mg/dL）の相関図を示す。

図4は、本発明方法（図4中、DB HDL-Cと表示）で得られるHDLコレステロール濃度（mg/dL）と対照方法（L HDL-C方法、図4中、S HDL-Cと表示）で得られるHDLコレステロール濃度（mg/dL）の相関図を示す。

#### 実施例4

##### 第1試薬（pH 7.25）

PIPES（ナカライテスク社製） 50mM

HDAOS（同仁化学社製） 0.3mg/mL

##### 第2試薬（pH 7.25）

PIPES（ナカライテスク社製） 50mM

コレステロールエステラーゼ（リポプロテインリパーゼ、東洋紡社製）  
5U/mL

コレステロールオキシダーゼ（協和醸酵工業社製） 1U/mL

パーオキシダーゼ（東洋紡社製） 20U/mL

4-アミノアンチピリン（埼京化成社製） 0.51mg/mL

塩化カルシウム（和光純薬社製） 0.1mg/mL

界面活性剤（第1表に記載の種類と濃度）

検体として超遠心法によって人血清から分離されたHDL、LDL、VLDL、CMを使用した。なお、各リポ蛋白の画分は、福祉医療技術振興会より得た。該画分は、アドバンスド・リポド・リサーチ（Adv. Lipid. Res.）, 6（1968）[Practical methods for plasma lipoprotein analysis, Hatch F & Lees R] に従って調製されたものである。なお、本実験に使用した各リポ蛋白中のコ

レステロール濃度をデタミナーL TC II (協和メデックス社製) により定量した結果、HDLで73mg/dL、LDLで264mg/dL、VLDLで84mg/dL、CMで17mg/dLであった。

第1試薬300 $\mu$ Lに各検体4 $\mu$ Lを混合し5分間、37 $^{\circ}$ Cで保温した。このときの吸光度を測定し、次いで第2試薬100 $\mu$ Lを添加し反応させ、5分後の吸光度を測定した。日立7070自動分析装置を用い、主波長600nm、副波長700nmを用いた。

試料としてLDL画分を用いて得られた反応前後の吸光度差を $A_{LDL}$ 、HDL画分を用いて得られた反応前後の吸光度差を $A_{HDL}$ 、VLDL画分を用いて得られた反応前後の吸光度差を $A_{VLDL}$  およびCM画分を用いて得られた反応前後の吸光度差を $A_{CM}$ とした。

結果を第1表に示す。結果は、 $A_{HDL}/A_{LDL}$  値、 $A_{VLDL}/A_{LDL}$  値および $A_{CM}/A_{LDL}$  値を表した。これらの値が小さいほどLDLに特異的な定量条件であることを示す。

第1表

界面活性剤	濃度 (%)	$A_{HDL}/A_{LDL}$	$A_{VLDL}/A_{LDL}$	$A_{CM}/A_{LDL}$
フルロニック L-121	0.2	7. 3	6. 6	4. 6
エマルゲン L40	0.16			
フルロニック L-121	0.2	9. 6	13. 5	3. 2
ニオン HS-210	0.1			
フルロニック L-121	0.2	10. 2	7. 7	1. 2
エマルゲン 911	0.1			
フルロニック L-122	0.2	8. 1	8. 2	3. 4
エマルゲン L 40	0.16			
フルロニック L-121 (比較例 1)	0.2	34. 7	47. 9	16. 8
エマルゲン L-40 (比較例 2)	0.16	27. 8	39. 7	9. 7
ニオン HS-210 (比較例 3)	0.1	35. 5	35. 5	6. 1
ニオン HS-215 (比較例 4)	0.16	76. 8	33. 6	4. 7
ニオン NS-208. 5 (比較例 5)	0.24	44. 5	32. 4	51. 2
ニオン NS-208 (比較例 6)	0.08	30. 2	47. 3	28. 3
エマルゲン 911 (比較例 7)	0.1	22. 6	15. 9	3. 0
エマルゲン 810 (比較例 8)	0.2	24. 7	36. 8	5. 8
フルロニック L-122 (比較例 9)	0.2	38. 1	64. 1	19. 0

第1表に示すように、界面活性剤を組合わせて使用することにより、界面活性剤を単独で使用する場合に比べて、コレステロールの反応がLDLコレステロールに特異的となる。

## 実施例 5

第1試薬 (pH 6. 75)

MOPS (ナカライテスク社製)

50 mM

HDAOS (同仁化学社製)

0. 3 mg/mL

第2試薬 (pH 6.75)

MOPS (ナカライテスク社製) 50 mM

コレステロールエステラーゼ (リポプロテインリパーゼ、東洋紡績社製)

1 U/mL

コレステロールオキシダーゼ (協和醸酵工業社製) 3 U/mL

パーオキシダーゼ (東洋紡社製) 20 U/mL

4-アミノアンチピリン (埼京化成社製) 0.51 mg/mL

塩化カルシウム (和光純薬工業社製) 0.1 mg/mL

界面活性剤 (第2表に記載の種類と濃度)

第2表の界面活性剤を用いる以外は、実施例4と同様に試験し、 $A_{LDL}$ 、 $A_{HDL}$ 、 $A_{VLDL}$ および $A_{CM}$ を求め、 $A_{HDL}/A_{LDL}$ 値、 $A_{VLDL}/A_{LDL}$ および $A_{CM}/A_{LDL}$ を算出した。なお、本実験に使用した各リポ蛋白中のコレステロール濃度をデタミナーL TC II (協和メデックス社製) により定量した結果は、HDLで81 mg/dL、LDLで263 mg/dL、VLDLで72 mg/dL、CMで14 mg/dLであった。

結果を第2表に示す。

第2表

界面活性剤	濃度 (%)	$A_{HDL}/A_{LDL}$	$A_{VLDL}/A_{LDL}$	$A_{CM}/A_{LDL}$
フルニック L-101	0.2	8.7	7.3	2.6
エマルゲン L-40	0.16			
フルニックP-103	0.2	13.0	3.9	1.7
エマルゲン L-40	0.16			
フルニック F-108	0.2	15.0	4.5	1.4
エマルゲン L-40	0.16			
エマルゲン L-40 (比較例10)		26.5	24.6	4.7
フルニック L-101 (比較例11)	0.2	19.0	14.3	5.6
フルニックP-103 (比較例12)	0.2	24.8	3.5	1.1
フルニック F-108 (比較例13)	0.2	28.8	17.8	1.6

第2表に示すように、界面活性剤を組合わせて使用することにより、界面活性剤を単独で使用する場合に比べて、コレステロールの反応がLDLコレステロールに特異的となる。

## 実施例6

第1試薬 (pH 6.75)

MOPS (ナカライテスク社製) 20mM

HDAOS (同仁化学社製) 0.3mg/mL

第2試薬 (pH 6.75)

MOPS (ナカライテスク社製) 20mM

コレステロールエステラーゼ (リポプロテインリパーゼ、東洋紡績社製)

2U/mL

コレステロールオキシダーゼ (協和醸酵工業社製)

3U/mL

パーオキシダーゼ (東洋紡社製)

20U/mL

4-アミノアンチピリン (埼京化成社製)

0.51mg/mL

塩化カルシウム（和光純薬工業社製）

0.1 mg/mL

界面活性剤（第3表に記載の種類と濃度）

第3表の界面活性剤を用いる以外は、実施例4と同様に試験し、 $A_{LDL}$ 、 $A_{HDL}$ 、 $A_{VLDL}$ および $A_{CM}$ を求め、 $A_{HDL}/A_{LDL}$ 値、 $A_{VLDL}/A_{LDL}$ および $A_{CM}/A_{LDL}$ を算出した。なお、本実験に使用した各リポ蛋白中のコレステロール濃度をデタミナーL TC II（協和メデックス社製）により定量した結果は、HDLで85 mg/dL、LDLで252 mg/dL、VLDLで75 mg/dL、CMで19 mg/dLであった。

結果を第3表に示す。

第3表

界面活性剤	濃度 (%)	$A_{HDL}/A_{LDL}$	$A_{VLDL}/A_{LDL}$	$A_{CM}/A_{LDL}$
フルニク L-121	0.7	4.0	5.0	3.4
エマルゲン L-40	0.5			

第3表に示すように、界面活性剤を組合わせて使用することで、LDLコレステロールを特異的に測定できる。

#### 実施例7

第1試薬 (pH 7.0)

MOPS（ナカライテスク社製）

10 mM

HDAOS（同仁化学社製）

0.3 mg/mL

第2試薬 (pH 7.0)

MOPS（ナカライテスク社製）

50 mM

コレステロールエステラーゼ（リポプロテインリパーゼ、東洋紡績社製）

1 U/mL

コレステロールオキシダーゼ（協和醸酵工業社製）

3 U/mL

パーオキシダーゼ（東洋紡社製）

20 U/mL

4-アミノアンチピリン (埼京化成社製) 0.51 mg/mL  
 塩化カルシウム (和光純薬工業社製) 0.1 mg/mL  
 界面活性剤 (第4表に記載の種類と濃度)

第4表の界面活性剤を用いる以外は、実施例4と同様に試験し、 $A_{LDL}$ 、 $A_{HDL}$ 、 $A_{VLDL}$ および $A_{CM}$ を求め、 $A_{HDL}/A_{LDL}$ 値、 $A_{VLDL}/A_{LDL}$ および $A_{CM}/A_{LDL}$ を算出した。なお、本実験に使用した各リポ蛋白中のコレステロール濃度をデタミナーL TC II (協和メデックス社製) により定量した結果は、HDLで79 mg/dL、LDLで273 mg/dL、VLDLで76 mg/dL、CMで16 mg/dLであった。

結果を第4表に示す。

第4表

界面活性剤	濃度 (%)	$A_{HDL}/A_{LDL}$	$A_{VLDL}/A_{LDL}$	$A_{CM}/A_{LDL}$
フロンック L-121	0.4	2.5	5.8	1.3
エマルゲン L-40	0.32			

第4表に示すように、界面活性剤を組合わせて使用することで、LDLコレステロールを特異的に測定できる。

#### 実施例8

第1試薬 (pH 7.0)

MOPS (ナカライテスク社製) 10 mM  
 HDAOS (同仁化学社製) 0.3 mg/mL  
 塩化マグネシウム6水塩 (関東化学社製) 7 mg/dL  
 デキストラン硫酸ナトリウム (東京化成社製) 0.7 mg/dL

第2試薬 (pH 6.75)

MOPS (ナカライテスク社製) 50 mM  
 コレステロールエステラーゼ (リポプロテインリパーゼ、東洋紡績社製)

	1 U/mL
コレステロールオキシダーゼ (協和醸酵工業社製)	3 U/mL
パーオキシダーゼ (東洋紡績社)	20 U/mL
4-アミノアンチピリン (埼京化成社製)	0.51 mg/mL
塩化カルシウム (和光純薬工業社製)	0.1 mg/mL
界面活性剤 (第5表に記載の種類と濃度)	

第4表の界面活性剤を用い、第2試薬添加直後の吸光度と第2試薬添加5分後の吸光度を測定し、この吸光度の差を $A_{LDL}$ 、 $A_{HDL}$ 、 $A_{VLDL}$ および $A_{CM}$ をとする以外は実施例4と同様に試験し、 $A_{HDL}/A_{LDL}$ 値、 $A_{VLDL}/A_{LDL}$ および $A_{CM}/A_{LDL}$ を算出した。なお、本実験に使用した各リポ蛋白中のコレステロール濃度をデタミナーL TC II (協和メデックス社製)により定量した結果は、HDLで79 mg/dL、LDLで273 mg/dL、VLDLで76 mg/dL、CMで16 mg/dLであった。

結果を第5表に示す。

第5表

界面活性剤	濃度 (%)	$A_{HDL}/A_{LDL}$	$A_{VLDL}/A_{LDL}$	$A_{CM}/A_{LDL}$
フルロニック L-121	0.4	2.6	4.6	1.3
エマルゲン L-40	0.32			

第5表に示すように、界面活性剤を組合わせて使用することで、LDLコレステロールを特異的に測定できる。

#### 実施例9

第1試薬 (pH 7.0)

MOPS (ナカライテスク社製)	10 mM
HDAOS (同仁化学社製)	0.3 mg/mL
塩化マグネシウム6水塩 (関東化学社製)	7 mg/dL



デキストラン硫酸ナトリウム (東京化成社製)	0.7 mg/dL
第2試薬 (pH 7.0)	
MOPS (ナカライテスク社製)	50 mM
コレステロールエステラーゼ (リポプロテインリパーゼ、東洋紡績社製)	1 U/mL
コレステロールオキシダーゼ (協和発酵工業社製)	0.6 U/mL
パーオキシダーゼ (東洋紡績社製)	20 U/mL
4-アミノアンチピリン (埼京化成社製)	0.51 mg/mL
塩化カルシウム (和光純薬工業社製)	0.1 mg/mL
界面活性剤 (第6表に記載の種類と濃度)	

第6表の界面活性剤を用いる以外は、実施例8と同様に試験し、 $A_{LDL}$ 、 $A_{HDL}$ 、 $A_{VLDL}$ および $A_{CM}$ を求め、 $A_{HDL}/A_{LDL}$ 値、 $A_{VLDL}/A_{LDL}$ および $A_{CM}/A_{LDL}$ を算出した。なお、本実験に使用した各リポ蛋白中のコレステロール濃度をデータミナーL TC II (協和メデックス社製)により定量した結果は、HDLで82 mg/dL、LDLで270 mg/dL、VLDLで73 mg/dL、CMで14 mg/dLであった。

結果を第6表に示す。

第6表

界面活性剤	濃度 (%)	$A_{HDL}/A_{LDL}$	$A_{VLDL}/A_{LDL}$	$A_{CM}/A_{LDL}$
プルロニック L-121	0.375	2.5	4.3	1.4
エマルゲン L-40	0.30			
プルロニック L-121	0.7125	2.5	2.2	1.8
エマルゲン L-40	0.57			

第6表に示すように、界面活性剤を組合わせて使用することで、LDLコレステロールを特異的に測定できる。

## 実施例 10

## 第1試薬 (pH 7.25)

PIPES (ナカライテスク社製) 50 mM

HDAOS (同仁化学社製) 0.3 mg/mL

## 第2試薬 (pH 7.25)

PIPES (ナカライテスク社製) 50 mM

コレステロールエステラーゼ (リポプロテインリパーゼ、東洋紡績社製)  
2 U/mL

コレステロールオキシダーゼ (協和醸酵工業社製) 3 U/mL

パーオキシダーゼ (東洋紡績社製) 20 U/mL

4-アミノアンチピリン (埼京化成社製) 0.51 mg/mL

塩化カルシウム (和光純薬工業社製) 0.1 mg/mL

エマルゲン L-40 (花王社製) 0.16%

ブルロニック L-121 (旭電化社製) 0.2%

検体として患者の血清 88 検体を用意し、下記の操作により検体中の LDL コレステロールの定量を行った。第1試薬 300  $\mu$ L に各検体 4  $\mu$ L に混合し 5 分間、37℃で保温した。このときの吸光度を測定し、次いで第2試薬 100  $\mu$ L を添加し反応させ、5分後の吸光度を測定した。一方 LDL コレステロール既知濃度の血清を同様な操作をして吸光度を測定することにより、検体中のコレステロールを定量した。測定には、日立 7070 自動分析装置を用い、主波長 600 nm、副波長 700 nm とした。

一方、市販キットである デタミナー L TC (協和メデックス社製) で総コレステロールを、デタミナー L HDL-C (協和メデックス社製) で HDL-コレステロールを、デタミナー L TG (協和メデックス社製) で中性脂肪を測定し下記のフリーデワルド (Friedewald) の計算式から LDL コレステロール濃度を求めた。本発明方法で得られる LDL コレステロール濃度とフリーデワルドの計

算式から求めたLDLコレステロール濃度の相関係数を計算したところ、0.9767となった。

フリーデワルドの計算式：

$$\begin{aligned} (\text{LDLコレステロール濃度}) = & (\text{総コレステロール濃度}) \\ & - (\text{HDLコレステロール濃度}) - (\text{中性脂肪濃度}) \div 5 \end{aligned}$$

図5は、本発明方法（図5中、本法と表示）で得られるLDLコレステロール濃度と対照方法（図5中、対照方法 と表示）で得られるLDLコレステロール濃度の相関図を示す。

#### 産業上の利用可能性

本願発明により、LDLコレステロールを定量する方法および該方法に用いる試薬キットが提供される。また本願発明により、同一試料中のHDLコレステロールとLDLコレステロールまたは総コレステロールを同一系内で連続的に分別定量する方法および該方法に用いる試薬キットが提供される。

## 請求の範囲

- (1) a) 生体試料、  
b) コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼ（以下、CH酵素類という）および  
c) 低密度リポ蛋白（以下、LDLという）中のコレステロール（以下、LDLコレステロールという）のみにb)記載のCH酵素類を作用させる試薬の存在下、コレステロールの反応を行い、生成する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりLDLコレステロール濃度を定量することを特徴とする、生体試料中のLDLコレステロールの定量方法。
- (2) LDLコレステロールのみにCH酵素類を作用させる試薬が、少なくともポリオキシエチレン誘導体とポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体とを含有する試薬である請求項(1)記載の定量方法。
- (3) ポリオキシエチレン誘導体が、ポリオキシエチレンアルキルエーテルまたはポリオキシエチレンアルキルアリアルエーテルである請求項(2)記載の定量方法。
- (4) ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体が一般式(I)  
$$\text{HO}-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a-(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_c-\text{H} \quad (\text{I})$$
  
[式中、a、bおよびcは同一または異なって1~200の整数を表す。]  
で表される界面活性剤である請求項(2)または(3)記載の定量方法。
- (5) a) 生体試料、  
b) CH酵素類および  
c) 高密度リポ蛋白（以下、HDLという）中のコレステロール（以下HDLコレステロールという）のみにb)記載のCH酵素類を作用させる試薬の存在下、第1のコレステロールの反応を行い、生成する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりHDLコレステロール濃度を定量し、次いで、  
d) LDLコレステロールのみにb)記載のCH酵素類を作用させる試薬を

添加して、第2のコレステロールの反応を行い、生成する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりLDLコレステロール濃度を定量することを特徴とする、生体試料中のHDLコレステロールおよびLDLコレステロールの分別定量方法。

(6) a) 生体試料、

b) CH酵素類および

c) HDLコレステロールのみにb)記載のCH酵素類を作用させる試薬の存在下、第1のコレステロールの反応を行い、生成する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりHDLコレステロール濃度を定量し、次いで、

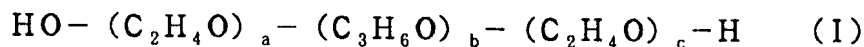
d) CH酵素類および

e) LDLコレステロールのみにd)記載のCH酵素類を作用させる試薬を添加して、第2のコレステロールの反応を行い、生成する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりLDLコレステロール濃度を定量することを特徴とする、生体試料中のHDLコレステロールおよびLDLコレステロールの分別定量方法。

(7) LDLコレステロールのみにCH酵素類を作用させる試薬が、少なくともポリオキシエチレン誘導体とポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体とを含有する試薬である請求項(5)または(6)記載の定量方法。

(8) ポリオキシエチレン誘導体が、ポリオキシエチレンアルキルエーテルまたはポリオキシエチレンアルキルアリールエーテルである請求項(7)記載の定量方法。

(9) ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体が一般式(I)



[式中、a、bおよびcは同一または異なって1~200の整数を表す。]

で表される界面活性剤である請求項(7)または(8)記載の定量方法。

(10) a) 生体試料、

b) CH酵素類および

c) HDLコレステロールのみにb)記載のCH酵素類を作用させる試薬の存在下、第1のコレステロールの反応を行い、生成する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりHDLコレステロール濃度を定量し、次いで、

d) 全てのリポ蛋白中のコレステロールにb)記載のCH酵素類を作用させる試薬を添加して、第2のコレステロールの反応を行い、生成する過酸化水素または還元型補酵素を測定することにより総コレステロール(HDL、LDL、VLDL、およびCM中の全コレステロールをいう)を定量することを特徴とする、生体試料中のHDLコレステロールおよび総コレステロールの分別定量方法。

(11) a) 生体試料、

b) CH酵素類および

c) HDLコレステロールのみにb)記載のCH酵素類を作用させる試薬の存在下、第1のコレステロールの反応を行い、生成する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりHDLコレステロール濃度を定量し、次いで、

d) CH酵素類および

e) 全てのリポ蛋白中のコレステロールにd)記載のCH酵素類を作用させる試薬を添加して、第2のコレステロールの反応を行い、発生する過酸化水素または還元型補酵素を測定することにより総コレステロールを定量することを特徴とする、生体試料中のHDLコレステロールおよび総コレステロールの分別定量方法。

(12) HDL中のコレステロールのみにCH酵素類を作用させる試薬が、HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬である請求項(5)～(11)のいずれかに記載の定量方法。

(13) HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬がさらに凝集したリポ蛋白を溶解しない非イオン性界面活性剤を含有する請求項(12)記載の定量方法。

(14) HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬が、ヘパリンまたはその塩、

リンタングステン酸またはその塩、デキストラン硫酸またはその塩、ポリエチレングリコール、硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、硫酸化オリゴ糖またはその塩、もしくはこれらの混合物、および2価の金属塩からなる試薬である請求項(12)または(13)記載の定量方法。

(15) 第1のコレステロールの反応に使用するCH酵素類が化学修飾された酵素であり、第2のコレステロールの反応に使用するCH酵素類が化学修飾されていない酵素である請求項(6)または(11)記載の定量方法。

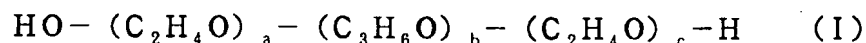
(16) 全てのリポ蛋白中のコレステロールにCH酵素類を作用させる試薬が、リポ蛋白を溶解する界面活性剤を含む試薬である請求項(10)～(15)のいずれかに記載の定量方法。

(17) CH酵素類およびLDLコレステロールのみにCH酵素類を作用させる試薬からなるLDLコレステロール定量用試薬。

(18) LDLコレステロールのみにCH酵素類を作用させる試薬が、少なくともポリオキシエチレン誘導体とポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体とを含有する試薬である請求項(17)記載のLDLコレステロール定量用試薬。

(19) ポリオキシエチレン誘導体が、ポリオキシエチレンアルキルアールエーテルである請求項(18)記載の定量試薬。

(20) ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体が一般式(I)



[式中、a、bおよびcは同一または異なって1～200の整数を表す。]

で表される界面活性剤である請求項(18)または(19)記載のLDLコレステロール定量用試薬。

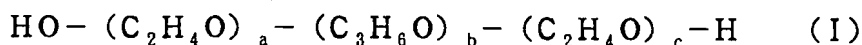
(21) 第1試薬にHDLリポ蛋白以外のリポ蛋白を凝集させる試薬およびCH酵素類を含有する試薬および第2試薬にLDLコレステロールのみにCH酵素類を作用させる試薬を含有する試薬からなる、HDLコレステロールとLDL

コレステロールとを分別定量するための試薬キット。

(22) LDLコレステロールのみにCH酵素類を作用させる試薬が、ポリオキシエチレン誘導体とポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体とを含有する試薬である請求項(21)記載の試薬キット。

(23) ポリオキシエチレン誘導体が、ポリオキシエチレンアルキルアリアルエーテルである請求項(21)記載の試薬キット。

(24) ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体が一般式(I)



[式中、a、bおよびcは同一または異なって1~200の整数を表す。]

で表される界面活性剤である請求項(21)または(22)記載の試薬キット。

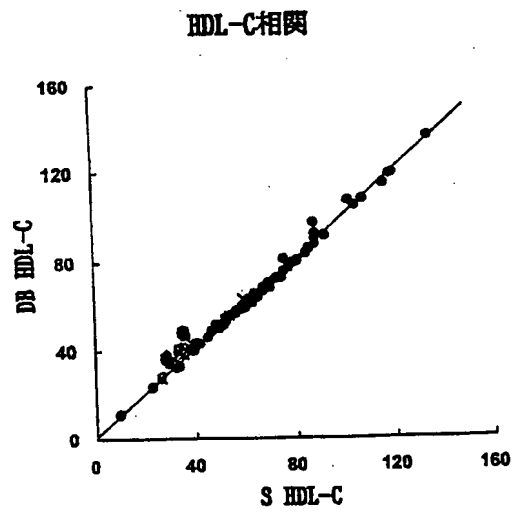
(25) 第1試薬にHDLリポ蛋白以外のリポ蛋白を凝集させる試薬およびCH酵素類を含有する試薬および第2試薬に全リポ蛋白中のコレステロールにCH酵素類を作用させる試薬を含有する試薬からなる、HDLコレステロールと総コレステロールとを分別定量するための試薬キット。

(26) 全てのリポ蛋白中のコレステロールにCH酵素類を作用させる試薬が、リポ蛋白を溶解する界面活性剤を含む試薬である請求項(25)記載の試薬キット。

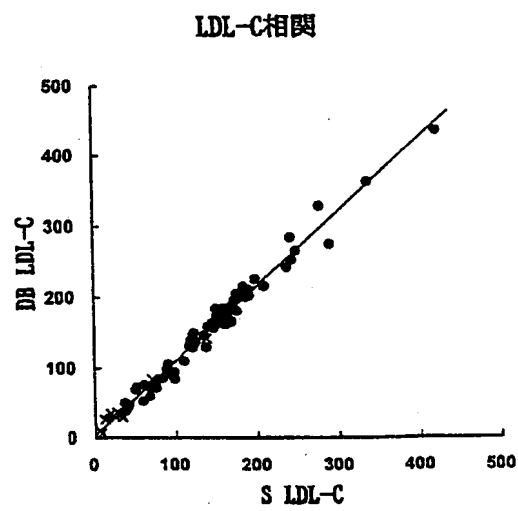
(27) HDLリポ蛋白以外のリポ蛋白を凝集させる試薬が、ヘパリンまたはその塩、リンタングステン酸またはその塩、デキストラン硫酸またはその塩、ポリエチレングリコール、硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、硫酸化オリゴ糖またはその塩、もしくはこれらの混合物、および2価の金属塩からなる試薬である請求項(21)~(26)のいずれかに記載の試薬キット。



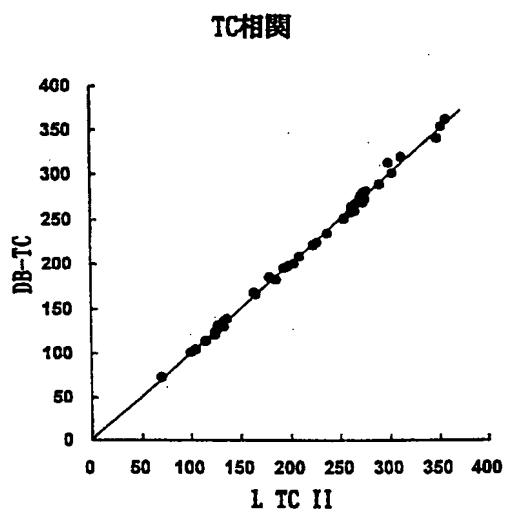
第1図



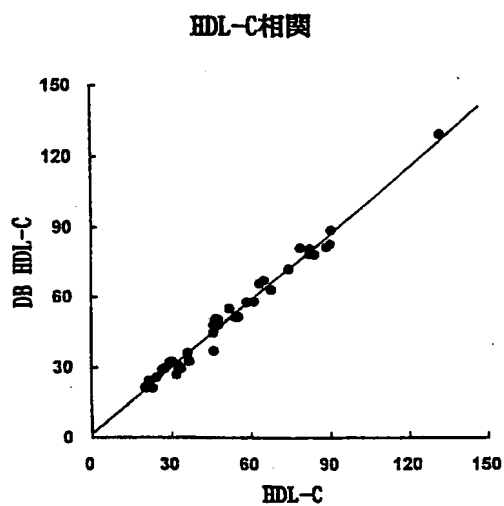
第2図



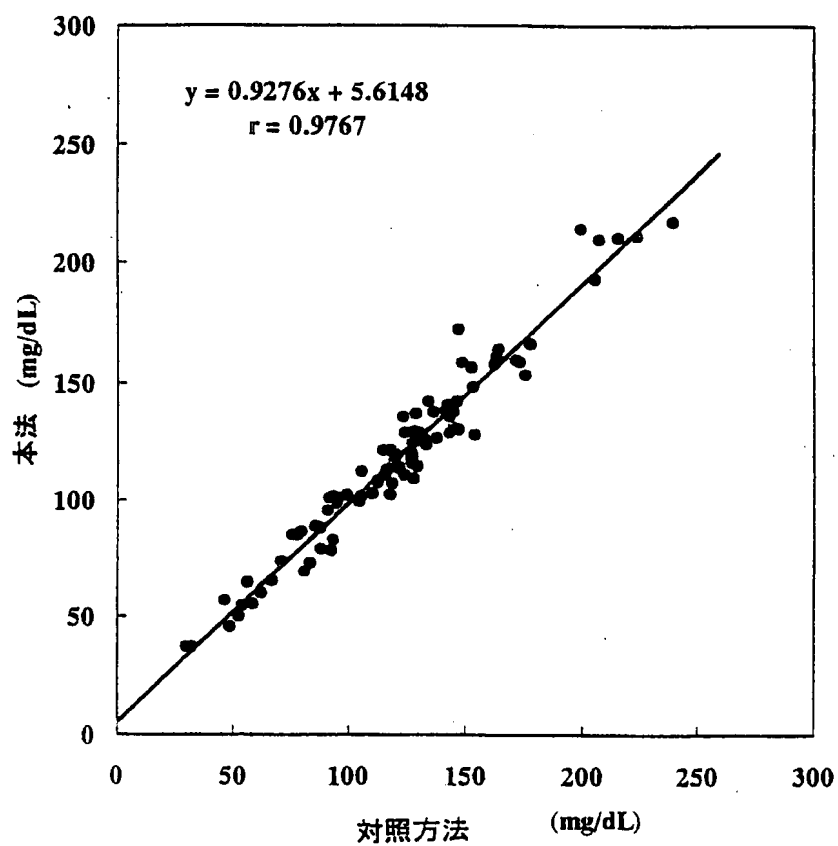
第3図



第4図



第5図



[不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する陳述]

"Statement Concerning Non-Prejudicial Disclosures or Exceptions to lack of Novelty"

出版日： 1998年8月1日

Publication Date: 01. 08. 98

出版者： 日本臨床検査自動化学会

Publisher: Japan Society of Clinical Laboratory Automation

刊行物名： 日本臨床検査自動化学会

第30回大会 予講集 VOL. 23 (4), 1998

Title of the Publication: Japanese Journal of Clinical Laboratory Automation, Vol. 23(4), 1998

Proceedings of the 30<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Society of  
Clinical Laboratory Automation

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04128

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>6</sup> C12Q1/60, C12Q1/44, C12Q1/26		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>6</sup> C12Q1/60, C12Q1/44, C12Q1/26		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 6-242110, A (International Reagents Corp.), 2 September, 1994 (02. 09. 94) (Family: none)	5-16, 21-26
A	JP, 8-131197, A (Kyowa Medex Co., Ltd.), 28 May, 1996 (28. 05. 96) & WO, 95/24502, A1 & EP, 699767, A1 & US, 5691159, A	5-16, 21-26
X/A	Clin, Chem., Vol. 44, No. 3 (March, 1998) Sugiuchi H. et al.; "Homogeneous assay for measuring low- density lipoprotein cholesteryl in serum with triblock copolymer and alpha-cyclodextrin sulfate", p.522-531	17-20/ 1-9, 21-24
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 September, 1999 (22. 09. 99)		Date of mailing of the international search report 5 October, 1999 (05. 10. 99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/04128

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>6</sup> C12Q1/60; C12Q1/44, C12Q1/26		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>6</sup> C12Q1/60, C12Q1/44, C12Q1/26		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
MEDLINE (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 6-242110, A (国際試薬株式会社) 2. 9月. 1994 (02. 09. 94) (ファミリーなし)	5-16, 21-26
A	JP, 8-131197, A (協和メデックス株式会社) 28. 5月. 1996 (28. 05. 96) & WO, 95/24502, A1 & EP, 699767, A1 & US, 5691159, A	5-16, 21-26
X/A	Clin. Chem., Vol. 44, No. 3 (1998. 3月) Sugiuchi H. et al.; "Homogeneous assay for measuring low-density lipoprotein cholesterol in serum with triblock copolymer and alpha- cyclodextrin sulfate", p. 522-531	17-20/ 1-9, 21-24
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	22. 09. 99	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 滝本 晶子 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3448
		4 B 9 4 5 2